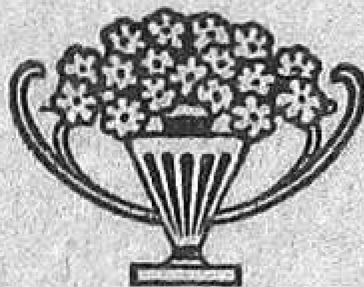
La Pediatria - **Rivista quindicinale d' igiene e di medicina dell' infanzia**
diretta da R. JEMMA - Estratto dal vol. 32, fasc. 14, 1924

ISTITUTO DI CLINICA PEDIATRICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTO DAL PROF. G. CARONIA

RICERCHE SULLA ETIOLOGIA DELLA RABBIA

Nota preventiva

del **Prof. G. CARONIA** e della **Dott.ssa M. B. SINDONI**



NAPOLI
Stab. Tip. "LA NUOVISSIMA"
Portamedina alla Pignasecca, 44
1924

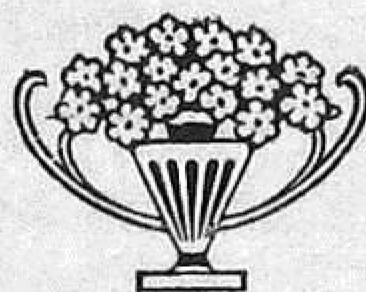
La Pediatria - **Rivista quindicinale d' igiene e di medicina dell' infanzia**
diretta da R. JEMMA - Estratto dal vol. 32, fasc. 14, 1924

ISTITUTO DI CLINICA PEDIATRICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTO DAL PROF. G. CARONIA

RICERCHE SULLA ETIOLOGIA DELLA RABBIA

Nota preventiva

del **Prof. G. CARONIA** e della **Dott.ssa M. B. SINDONI**



NAPOLI
Stab. Tip. "LA NUOVISSIMA"
Portamedina alla Pignasecca, 44
1924

Istituto di Clinica Pediatrica della R. Università di Roma
diretto dal Prof. G. Caronia

Un caso di rabbia in un bambino, venuto di recente alla nostra osservazione, ci ha indotto ad intraprendere alcune ricerche sulla etiologia di questo terrificante morbo.

Non ostante che la rabbia rappresenti una tra le prime malattie infettive di cui si sia potuto isolare il virus ed utilizzarlo ai fini di una razionale profilassi, iniziando il periodo veramente scientifico dell' immunità, non possiamo ancora dire di conoscerne l'agente etiologico.

I tentativi per pervenire a tale identificazione sono numerosi, ma i risultati sono ancora incerti.

Gli studi del Negri su speciali inclusioni delle cellule del corno di Ammone e le successive osservazioni in proposito di molti altri AA. avevano fatto prevedere prossima l'identificazione del germe della rabbia; ma pare oggi esclusa la natura parassitaria dei corpi del Negri ed è anche discussa la loro specificità da recenti osservazioni di formazioni uguali in altre forme morbose (Poor, Luzzani, Pace, Babès, Staffuso, Volpino, Desderi, Levaditi, Herviér e Nicolau, Da Zano, Inglebey).

Più suggestive sono le ricerche culturali del Noguchi. Questo autore, utilizzando i metodi di cultura della spirochete pallida, riuscì ad ottenere con l' innesto di virus fisso o di passaggio lo sviluppo di piccoli corpuscoli granulari e di corpi più grandi cromatoidi, rotondi od ovali, nucleati, circondati da tenue membrana. Queste forme grandi da 1 a 12 micron, si moltipli-

cherebbero per scissione o per gemmazione e sarebbero, sempre secondo Noguchi, forme protozoarie, non batteriche. La loro apparizione nelle culture è quasi istantanea e abbondante, dura 3-4 giorni e poi si ha diminuizione che coincide con l'aumento dei corpuscoli granulari, di cui i più piccoli sono al limite della visibilità. L'inoculazione di queste culture nei cani, nei conigli, nelle cavie provoca la rabbia. Non è detto però dall'A. la generazione adoperata.

Volpino, controllando le ricerche di Noguchi, trova gli stessi corpuscoli cromatoidi sia nei tubi inoculati che in quelli non inoculati e li ritiene quindi lipoidi del liquido ascitico.

Risultati analoghi riferiscono Kraus e Barbara, i quali inoltre con l'inoculazione agli animali dei terreni innestati non ottengono la riproduzione della malattia.

Proescher, innestando cervello infetto in terreni a base di siero di montone in anaerobiosi, ottiene sviluppo di speciali cocchi molto piccoli (da 0,2 a 0,3 μ), talvolta a diplo, talvolta a catenella. Le forme più grandi sono gramnegative, le più piccole grampositive e infine tutte diventano grampositive. Con l'inoculazione ai conigli ed ai ratti di queste culture riesce a riprodurre la rabbia, ma non dice con quale generazione.

Levaditi, coltivando le cellule nervose col metodo di Carrel, conserva il virus rabbico fino alla 5ª generazione; ma in questo caso non si può parlare di vera e propria cultura.

Recentissimamente Manuelian e Viala descrivono uno speciale reperto microscopico nel sistema nervoso e nelle ghiandole salivari di cani idrofobi. Si tratta di corpuscoli allungati, fusiformi, a navetta, quasi sempre intracellulari, che gli autori, per analogia con i corpi descritti da Writgh e nell'encefalite dei conigli, chiamano encephalitozoon rabïei e che starebbero a rappresentare i veri parassiti della rabbia, dai quali per fenomeni degenerativi deriverebbero i corpi del Negri. Sulla loro natura, in base a semplici reperti microscopici che attendono conferma, non è ancora possibile pronunciarsi.

Le ricerche da noi intraprese e di cui ci apprestiamo a riferire i primi risultati sono state condotte con virus fisso e con virus del bambino morto di rabbia cui abbiamo accennato: e sono ricerche culturali, batterioscopiche, di riproduzione sperimentale.

Ricerche culturali.

Ci siamo avvalsi nei nostri tentativi culturali di speciali terreni preparati con brodo-ascite o semplice ascite, con brodo-ascite o sola ascite e pezzetti di sostanza nervosa di coniglio sano, nonchè dei comuni terreni di Tarozzi-Noguchi con brodo-ascite e pezzetti di fegato o di rene. Dopo i primi vani tentativi in aerobiosi, abbiamo lavorato sempre in anaerobiosi ottenuta mediante stratificazione con olio di vasellina.

I terreni di brodo-ascite o sola ascite li abbiamo adoperati soltanto per l' innesto di pezzetti di cervello proveniente da conigli inoculati con virus fisso e già in periodo paralitico.

Per i passaggi successivi e per l'innesto di filtrato di virus fisso o di filtrato di cervello, di saliva, di urina di bambino idrofobo, ci siamo sempre avvalsi di terreni con pezzetti di organo (cervello, o rene, o fegato).

Nei terreni di brodo-ascite o sola ascite, semplici o con aggiunta di pezzetti di cervello di cavia o di coniglio sani, innestati con pezzetti di sostanza nervosa (midollo spinale, bulbo, cervello) di coniglio idrofobo in periodo paralitico e tenuti a 37° e in anaerobiosi, abbiamo osservato un lievissimo intorbidamento dopo circa 30 giorni.

Nei terreni di Tarozzi-Noguchi innestati con virus fisso (pezzetto di sostanza nervosa o filtrato) o con il filtrato di sostanza nervosa o di liquido cefalo-rachidiano del bambino idrofobo si ha invece dopo 8-10 giorni un lievissimo intorbidamento come una nubecola che partendo dagli strati inferiori va guadagnando tutta la colonna liquida opacandola uniformemente nel periodo di 30-40 giorni. Verso il 60° giorno si ha un fine precipitato granulare al fondo e chiarificazione della colonna liquida.

Nei successivi passaggi culturali, dalle culture del primo tipo come da quelle del secondo tipo, non si ha sviluppo in terreni con brodo-ascite o ascite semplice senza pezzetto d'organo. Nei terreni di Tarozzi-Noguchi si ha invece intorbidamento e successiva precipitazione, come nelle culture di primo innesto, ma con intensità e rapidità maggiore. L' intorbidamento è sempre lieve e tardivo nelle culture preparate con pezzetto di sostanza nervosa.

Tubi culturali di controllo non innestati, stratificati con olio di vasellina e tenuti parimenti a 37° per lo stesso periodo di tempo, non presentano i fenomeni di opacamento che danno i tubi innestati.

Tutto al più e solo in quelli di Tarozzi-Noguchi (con fegato o rene) si può avere dopo 15-20 giorni un lieve deposito al fondo per autolisi del pezzetto d'organo.

Le ricerche microscopiche a goccia pendente e su preparati colorati eseguiti nei diversi momenti dello sviluppo culturale ci hanno fatto constatare i seguenti fatti:

In goccia pendente sino al 15°-20° giorno dall'innesto non si scorgono forme microbiche; solo scarsi granuli indefinibili forniti di movimenti browniani.

In questo stesso periodo gli strisci di culture colorati con bleu di metile, di Löffler, con Ziehl, Giemsa, Leishman non mettono in evidenza alcuna forma microbica. Solo in quelli colorati con Giemsa o Leishman si riesce a scorgere rari corpuscoli polimorfi di varie dimensioni (fino a 10 micron), di colore azzurro tenue, a margini non ben definiti, qualche volta contenenti fini granuli più intensamente colorati. È da notare che tali corpuscoli si hanno relativamente più abbondanti nei terreni preparati con sola ascite, meno abbondanti in quelli preparati con brodo-ascite. In culture in cui più evidente è l'opacamento verso il 15°-20° giorno gli strisci colorati fanno scorgere talvolta corpuscoli rotondeggianti piccolissimi che raggiungono appena il limite della visibilità.

Al di là del 20° giorno dall'innesto la goccia pendente mette in evidenza più numerose forme granulari, globoidi, spesso accoppiate, dotate di movimenti intorno al proprio asse.

Gli strisci colorati con bleu di Löffler, o con Giemsa, o con Leishman fanno scorgere corpuscoli rotondeggianti piccolissimi a margini ben definiti, nettamente colorati in bleu, spesso accoppiati e come circondati da un alone chiaro, evidente, in mezzo al quale spiccano i due elementi bleu. Sono grampositivi e le dimensioni del singolo corpuscolo vanno da μ 0,15 a μ 0,20.

L'osservazione di strisci di terreno culturale di controllo non mette mai in evidenza di queste formazioni granulari, ma con la colorazione Giemsa o Leishman è facile mettere in evidenza i corpi azzurro-tenue, non ben delimitati, sul tipo di quelli osservati nei terreni innestati durante i primi giorni di sviluppo.

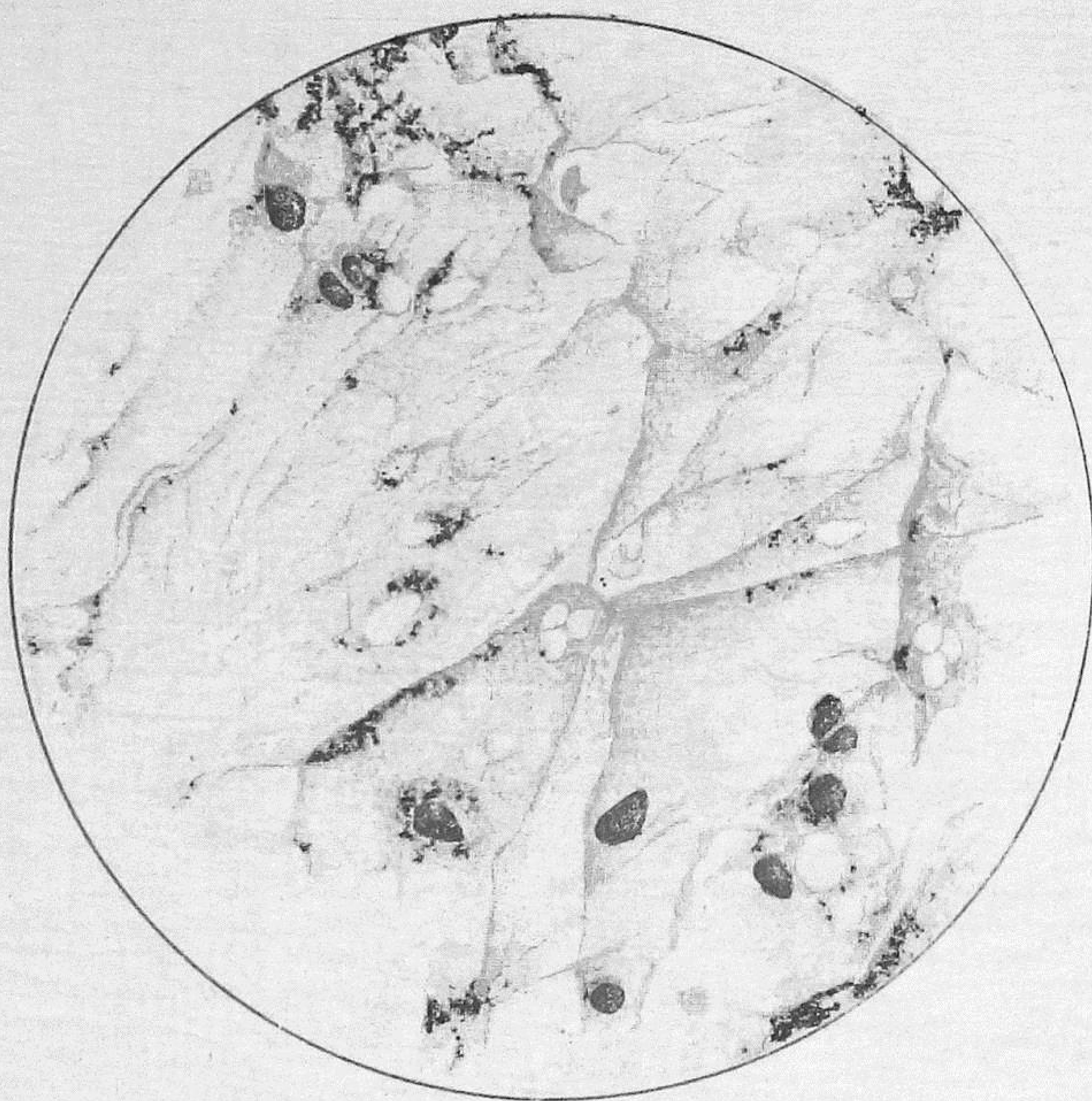


Fig. 1 — *Striscio di corno di Ammone di bambino morto di rabbia. Nel centro del campo un corpuscolo bigemino con alone chiaro, a sinistra in alto un corpuscolo isolato (color. Van Gieson, Imm. 1/12 — oc. 6 comp. Koristka).*

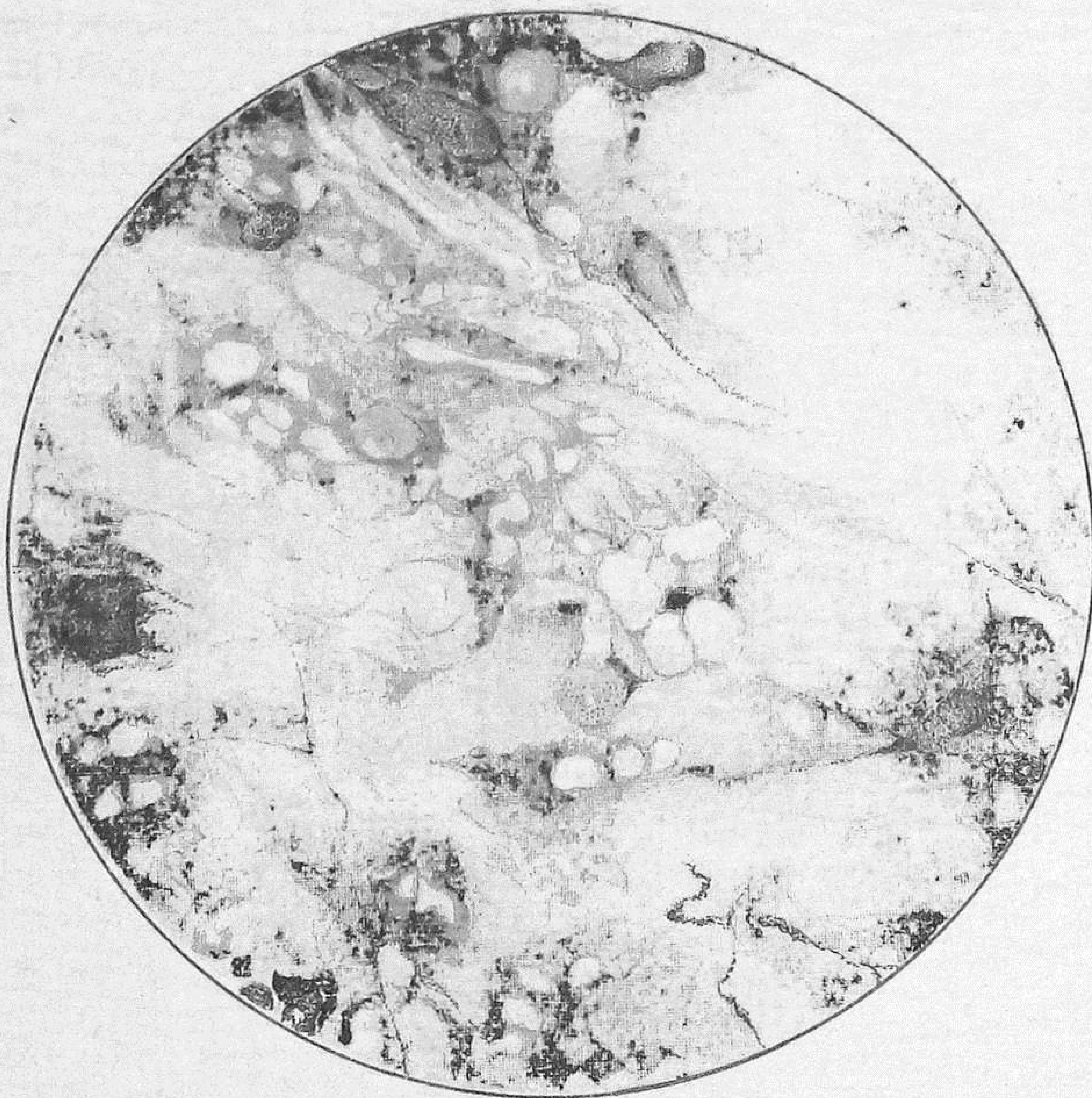


Fig. 2 — *Striscio di cervello di coniglio infetto con virus fisso, sacrificato all'inizio del periodo paralitico. Nel centro del campo un corpuscolo bigemino con alone chiaro. (Imm. 1/12 — oc. 6 comp. Koristka)*

STAB. LIT. MANZONI & DE LUCIA – NAPOLI

Nei passaggi successivi si ha sviluppo dei corpuscoli granulari ben delimitati, isolati o accoppiati, sì che oggi possiamo contare molte generazioni di uno stesso stipite e dobbiamo supporre che siano possibili i passaggi in serie infinita.

Inoltre, come si ha lo sviluppo culturale descritto dal filtrato di virus fisso o di virus di passaggio, così si ha lo sviluppo culturale dall' innesto di filtrato di cultura già sviluppata attraverso Berkefeld W e Chamberland L 7 ed L 9.

Evidentemente il germe attraversa fasi diverse prima di raggiungere la visibilità, fasi nelle quali è possibile il passaggio attraverso i filtri più stretti.

Ricerche microscopiche.

Sono state fatte ricerche microscopiche sia sul cervello e sul bulbo del bambino morto per rabbia, sia nei conigli infetti di virus fisso. Si son ricercati con gli opportuni metodi di colorazione i corpi del Negri ed altre eventuali formazioni.

Col metodo di Van Gieson costantemente, oltre i corpi del Negri, si son rintracciati parecchi minutissimi corpuscoli rotondeggianti, ben definiti, nettamente colorati in bleu, a coppia, e come circondati da un alone chiaro. Gli stessi corpuscoli si son rintracciati colorando col Giemsa. Meno rari nel cervello di conigli infetti con virus fisso e sacrificati prima della morte per evitare l' invasione preagonica di germi, più rari nel cervello del bambino idrofobo, ma perfettamente identici in tutti e due i casi.

Tali corpuscoli si sono più facilmente rintracciati negli strisci di corno d' Ammone.

Nella figura 1ª è riprodotta una coppia di questi corpuscoli in mezzo ad uno striscio di pezzetto di cervello di coniglio rabbioso. Nella figura 2ª lo stesso reperto in uno striscio di corno di Ammone del bambino morto di rabbia.

Tentativi di riproduzione sperimentale col germe culturale.

Ci siamo serviti per questi tentativi dei conigli, praticando l' iniezione intracranica di culture di diversa generazione..

Esperienza I. Un coniglio viene inoculato con 1 cc. di cultura di prima generazione al 32° giorno di sviluppo. A distanza di 5 giorni si ha paralisi di tutto il lato sinistro, midriasi, polipnea, emissione di bava; dopo poche ore la paralisi si generalizza e avviene la morte tra il 5° ed il 6° giorno.

Nel midollo allungato si riscontra presenza di corpuscoli del Negri e delle forme granulari descritte. L' innesto culturale di pezzetti di cervello dà sviluppo.

Esperienza II. Un coniglio viene inoculato per via intracranica con cc. 0,25 di cultura di 3ª generazione al 17° giorno di sviluppo. A distanza di 6 giorni l'animale sta rannicchiato in un angolo della gabbia, col pelo arruffato; è polipnoico è rifiuta il cibo.

Resta in tale stato per 4 giorni. Indi gradatamente ritorna al normale.

Esperienza III. Un coniglio viene inoculato con cc. 1 di cultura di 4ª generazione al 5° giorno di sviluppo. Al 18° giorno dall' inoculazione si ha paralisi delle estremità, midriasi, emissione di bava.

Viene sacrificato in questo momento. La ricerca nelle cellule nervose fa rilevare la presenza dei corpi del Negri e dei corpuscoli granulari accoppiati. Gli innesti culturali di pezzetti di cervello e di midollo allungato dà più tardi sviluppo con i caratteri descritti.

Esperienza IV. Un coniglio viene inoculato con 0,50 cc. di cultura della 4ª generazione al 18° giorno di sviluppo. A distanza di 38 giorni si ha paralisi generalizzata, midriasi, emissione di bava e dopo 48 ore morte.

Nelle cellule nervose del bulbo sono presenti i corpuscoli del Negri e forme granulari accoppiate. Gli innesti culturali danno esito positivo.

Esperienza V. Un coniglio viene inoculato con 1 cc. di cultura di 6ª generazione al 40° giorno di sviluppo. Al 38° giorno dall' inoculazione paralisi del treno posteriore; al 39° giorno accentuarsi della paralisi, midriasi; al 41° giorno paralisi generalizzata, morte.

Nelle cellule nervose presenza di curpuscoli del Negri e delle forme granulari accoppiate. L'innesto culturale di sostanza nervosa dà esito positivo.

Conclusioni

Questa prima serie di ricerche, che segnaliamo a solo titolo di documentazione, ci ha fatto rilevare quanto segue:

Dal cervello di coniglio infetto con virus fisso o sacrificato nel momento della paralisi si può ottenere in speciali terreni di Tarozzi-Noguchi ed in anaerobiosi lo sviluppo di un piccolo microrganismo che sta al limite della visibilità, rotondeggiante, isolato o accoppiato, colorabile con i comuni colori di anilina, specie con il bleu di Löffler, gram-positivo.

Negli strisci di midollo allungato di conigli infetti con virus fisso o con culture di generazioni diverse e negli strisci di cervello del bambino morto di rabbia, colorati con Van Gieson Leishman, Giemsa, si riesce a mettere in evidenza corpuscoli rotondeggianti, accoppiati, piccolissimi, in tutto identici a quelli osservati in cultura.

L' inoculazione ai conigli per via intracranica del liquido culturale di culture di generazioni diverse, dalla 1ª sino alla 6ª, provoca le tipiche manifestazioni della rabbia. Il periodo d' incubazione è diverso a secondo la quantità di cultura e a secondo la generazione: è breve con le culture di 1ª generazione adoperate in sufficiente quantità, è lungo con culture di generazioni più inoltrate Parimenti la gravità dell'infezione può stare in rapporto con la quantità di virus culturale inoculato (2ª esperienza).

Roma, 1 giugno 1924.
